

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**



**Produkce rekombinantních proteáz parazita *Schistosoma mansoni***

Bakalářská práce

Iveta Červenková

Školitel: Jan Dvořák, Ph.D.

České Budějovice 2012

Červenková I., 2012: Produkce rekombinantních proteáz parazita *Schistosoma mansoni*. [Production of *Schistosoma mansoni* recombinant proteases. Bc. Thesis, in Czech.] – 32 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: Some of *Schistosoma mansoni* proteolytic enzymes may have role in host–parasite interactions. Main aim of this thesis is focused on a recombinant expression of two, not yet characterized schistosoma serine proteases under GeneDB identification number Smp\_141450 and Smp\_103680. Several expression system have been tested in order to produce these proteolytic enzymes – *Escherichia coli* (BL21), *E. coli* (SHuffle) and *Kluyveromyces lactis*.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne:.....

.....

(Podpis)

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala svému školiteli Janu Dvořákovi, Ph. D. za odborné vedení mé práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Danu Sojkovi, Ph. D. a Bc. Davidu Opavskému za praktické rady a pomoc při provádění experimentů.

## Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Přehled zástupců čeledi Schistosomatidae .....	1
1.2. <i>Schistosoma mansoni</i> – taxonomické zařazení .....	2
1.3. Biologická charakteristika a vývojový cyklus <i>S. mansoni</i> .....	2
1.4. Interakce parazita s definitivním hostitelem .....	4
1.5. Charakteristika proteáz.....	7
2. Cíle práce .....	10
3. Materiály a metody .....	11
3.1. Izolace genetického materiálu .....	11
3.2. Amplifikace DNA pomocí PCR.....	11
3.3. Zaklonování do expresních vektorů (plazmidů) a sekvenace .....	13
3.3.1. <i>E. coli</i> (pET 100) .....	13
3.3.2. Anotace sekvencí .....	13
3.3.3. <i>K. lactis</i> (pKLAC2) .....	14
3.4. Expresní systémy.....	14
3.5. Exprese .....	14
3.5.1. Exprese v <i>E. coli</i> (BL21) .....	14
3.5.2. Exprese v <i>E. coli</i> SHuffle .....	15
3.5.3. Exprese v <i>K. lactis</i> .....	15
3.6. Měření aktivity enzymu .....	15
3.7. SDS-PAGE elektroforéza.....	16
3.8. Purifikace proteinů .....	16
4. Výsledky .....	18
4.1. Sekvence.....	18
4.2. Vyhodnocení exprese .....	20
4.2.1. <i>E. coli</i> BL21 .....	20
4.2.2. Aktivita enzymů exprimovaných v <i>E. coli</i> SHuffle a <i>K. lactis</i> .....	21
4.3. SDS-PAGE elektroforéza.....	21
5. Diskuze .....	22
6. Závěr. ....	24
7. Zdroje.....	25

## 1. Úvod

### 1.1. Přehled zástupců čeledi Schistosomatidae

Čeď Schistosomatidae tvoří přibližně sto druhů, které jsou zařazeny do 14 rodů (Khalil, 2002, cit. dle Lockyer et al., 2003). Rozdělní rodu *Schistosoma*, který jako jediný z čeledi parazituje u člověka, je založeno na morfologii vajec, druhu meziphostitele, rozšíření a genetickém základu. Tyto aspekty rozdělují rod do 4 skupin (Rollinson and Southgate, 1987, Lockyer et al., 2003).

První skupinu reprezentuje *Schistosoma mansoni*, jejíž hrot na vajíčku je umístěn laterálně a jejímž hostitelem je *Biomphalaria* (Planorbidae) (Lockyer et al., 2003). Vyskytuje se v Africe, Jižní Americe a Karibiku. Do skupiny k *S. mansoni* řadíme také *S. rodhaini* parazitující u hlodavců a *S. edwardiense* a *S. hippopotami*, jejichž hostitelem jsou hroši.

Druhou skupinu představuje africký druh *S. haematobium*, ta má hrot na vajíčku umístěn terminálně, na konci, a jejím meziphostitelem jsou plži rodu *Bulinus* (Planorbidae). Řadíme k ní ještě další zástupce, např. *S. intercalatum*, je též parazitem člověka a parazity dobytka a ovcí – *S. bovis*, *S. mattheei* a *S. curassoni* (Lockyer et al., 2003).

Třetí skupina zahrnuje *S. japonicum* (Lockyer et al., 2003). Její vajíčka jsou kulatá pouze s nepatrným hrotem a je rozšířena po východní Asii. Řadí se k ní i další asijské druhy – *S. sinensium*, *S. mekongi*, *S. malayensis* a *S. ovuncatum*. *S. mekongi* i *S. japonicum* jsou paraziti lidí.

Čtvrtá skupina se vyskytuje především v Indii, hlavním zástupcem je *S. indicum*, k němu řadíme i *S. incognitum* a *S. spindale* a *S. nasale* (Lockyer et al., 2003). Morfologie vajíček zástupců této skupiny se různí. (Rollinson and Southgate, 1987).

Biogeografické rozšíření skupin a původ rodu *Schistosoma* se vysvětluje dle tzv. asijské hypotézy tj., že se původní předek nacházel v Asii (Morgan et al., 2001, cit. dle Lockyer et al., 2003). Do Afriky byla *Schistosoma* rozšířena při velké migraci savců před 12–19 miliony lety. Předek, který zůstal v Asii se rozrůznil na druhy, které zahrnujeme do skupiny k *S. japonicum*. Africká linie divergovala do představitelů skupin *S. haematobium* a *S. mansoni*. Skupina *S. indicum* migrovala zpět do Indie, pravděpodobně s původními lidmi a savci. *S. mansoni* se během obchodu s otroky rozšířila i do Jižní Ameriky (Després et al., 1993, cit. dle Lockyer et al., 2003).

Kromě rodu *Schistosoma* zahrnuje čeď Schistosomatidae i další rody, které parazitují na savcích a ptácích. Konkrétně se jedná o rody *Schistosomatium*, *Heterobilharzia*,

*Dendrobilharzia*, *Giantobilharzia*, *Trichobilharzia*, *Bilharziella*, *Ornithobilharzia* a *Austrobilharzia* (Lockyer et al., 2003).

### 1.2. *Schistosoma mansoni* – taxonomické zařazení

Krevnička střevní (*Schistosoma mansoni*) je parazitický organismus ze třídy Trematoda – motolice. Jedná se o lidskou krevní motolici z čeledi Schistosomatidae (řád Strigeidida). Taxonomické zařazení *S. mansoni* je v tabulce I. Čeleď Schistosomatidae zahrnuje především parazity ptáků a savců.

**Tab. I.: Taxonomické zařazení rodu *Schistosoma* (Despommier and Karapelou, 1987).**

Taxon	Latinský název	Český název
Říše	Animalia	živočichové
Kmen	Platyhelminthes	ploštěnci
Třída	Trematoda	motolice
Podtřída	Digenea	dvourodí
Řád	Strigeidida	
Čeleď	Schistosomatidae	
Rod	Schistosoma	krevnička

### 1.3. Biologická charakteristika a vývojový cyklus *S. mansoni*

Na rozdíl od většiny motolic jsou krevničky gonochoristé. Dospělé motolice mají válcovité tělo, které dorůstá délky 7-20 mm a na koncích je opatřeno přísavkami. Tělo je kryto tegumentem<sup>1</sup>, trávicí soustava je typická pro protostomata a má slepé zakončení. Delší a tenčí samice je uložena v rýze na těle většího a širšího samce – v tzv. *canalis gynecophorus* (McManus and Loukas, 2008).

Infekce definitivního hostitele začíná při kontaktu s vodním prostředím, kde se vyskytují volně se pohybující infekční larvy cercárie. Cercárie využívá proteolytických enzymů při průniku kůží definitivního hostitele (v případě *S. mansoni* – člověka). Cercárie při průniku ztratí ocásek a vstupuje do kapilár, nebo lymfatických cév, kterými postupuje dále do plic. Mladí červi – schistosomuly po několika dnech migrují do portálního žilního systému, kde dospívají a párují se. Pár se pak přesouvá do cév mezenteria (McManus and Loukas, 2008).

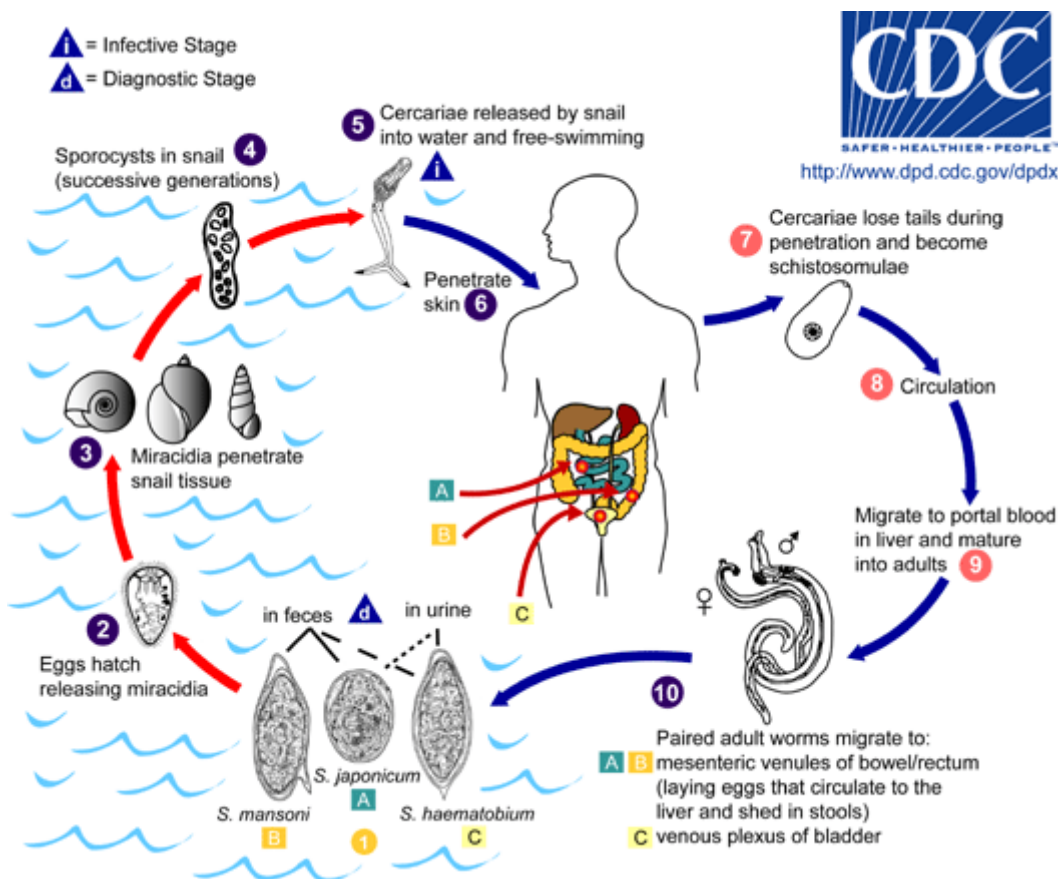
Produkce vajíček začíná 4–6 týdnů po nakažení a pokračuje po celý život parazita, což může být patnáct i více let. Samice produkuje stovky vajec denně, která klade do

<sup>1</sup> Tegument neboli neodermis je pokryv těla skládající se ze dvou lipidových dvouvrstev místo jedné. Slouží jako ochranná adaptace v nepřátelském prostředí krve. (Brant and Loker, 2005)

mezenterických žil (McManus and Loukas, 2008). Pomocí ostrého hrotu vejce prostupují skrz tkáň hostitele do střeva a tím stimulují zánětlivý proces. (Abdulla et al., 2011)

Průniku napomáhá i fyziologie hostitele – krevní tlak a peristaltika (Rollinson and Southgate, 1987). Přítomnost vajíček ve tkáni a následná imunitní odpověď je zodpovědná za vzniklou patologii. (McManus and Loukas, 2008). Vajíčko se v těle hostitele vyvíjí přibližně šest dní, zralá vajíčka odcházejí z těla hostitele stolicí. Ve vnějším prostředí čekají na příhodné podmínky k líhnutí – hlavními faktory jsou teplota, světlo a osmotický tlak. Líhnutí je čistě fyzikální proces, kdy voda proniká do vakuol vajíčka a tlak turgoru způsobí prasknutí skořápky (Rollinson and Southgate, 1987).

První larvální stádium – miracidium infikuje mezihostitele, kterým je sladkovodní plž (u *S. mansoni* je to rod *Biomphalaria*). Po dvou generacích sporocyst (mateřské a dceřiné) plže opouští pohyblivá cercárie vzniklá asexuálně. Tím se cyklus (Obr. 1) uzavírá (MacManus and Loukas, 2008).



Obr. 1: Životní cyklus *S. mansoni*. (Zdroj: CDC, dostupné online na: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Schistosomiasis.htm>).

#### 1.4. Interakce parazita s definitivním hostitelem

Interakce mezi parazitem a definitivním hostitelem probíhají na různých úrovních. S definitivním hostitelem interaguje jako první cercárie. Jedná se o pohyblivé pozitivně fototropické stádium, které do hostitele penetruje skrz kůži. K nalezení definitivního hostitele využívá termálního gradientu a dalších, především chemických signálů. Takovými chemickými signály jsou středně dlouhé mastné kyseliny, např. kyselina linoleová, nalézající se na povrchu kůže hostitele (McKerrow and Salter, 2002). Další biomolekuly jsou mukopolysacharidy, které cercárii pomáhají k přichycení k povrchu kůže definitivního hostitele. Cercárie proniká kůží hostitele, k čemuž jí pomáhají sekrety (enzymy a další biomolekuly) z acetabulárních žláz (McKerrow and Salter, 2002).

Samotný průnik cercárie skrz dermis je usnadňován proteolytickými enzymy (viz dále, McKerrow and Salter, 2002). Jedním z těchto enzymů je u *S. mansoni* cercáriová elastáza. Ta degraduje makromolekuly, mezi které patří i proteiny pokožky – keratin, elastiny, kolageny. (Ingram et al., 2011). Ale roli při průniku hrají pravděpodobně i další proteázy (Dvořák et al., 2008).

V definitivním hostiteli se cercárie transformuje na schistosomulu, stádium adaptované na život v hostitelském prostředí. Schistosomula se v hostiteli vyvíjí v dospělého jedince (životní cyklus parazita viz výše). Ani schistosomula, ani dospělec nejsou rozpoznáváni imunitním systémem hostitele. Imunitní odpověď hostitele je naopak směřována vůči vajíčkům zachyceným ve tkáni (McManus and Loukas, 2008).

Na vývoj imunitní odpovědi hostitele působí několik faktorů jak hostitelského, tak parazitárního původu – jedná se o genetickou výbavu hostitele, intenzitu infekce, výskyt dalších infekcí atd. (McManus and Loukas, 2008). Jedním z hostitelských faktorů mohou být kortikosteroidy a nižší hladina T lymfocytů, které způsobují, že schistosoma dospívá později, než je obvyklé (Harrison and Doenhoff, 1983, cit. dle Davies and McKerrow, 2003).

Z klinického/medicínského hlediska rozlišujeme akutní a chronickou schistosomózu (průběh imunitní odpovědi viz Obr. 2). Akutní schistosomóza se projevuje tzv. „ horečkou Katayama “ – tj. oslabující horečka, která se objeví ještě předtím, než je možné nalézt vajíčka ve stolici. Nejvyšší je horečka mezi 6–8 týdnem po nakažení. Mechanismus odpovědi hostitele je v akutní fázi založen na Th1 buňkách (pomocné T-lymfocyty<sup>2</sup>) a působí

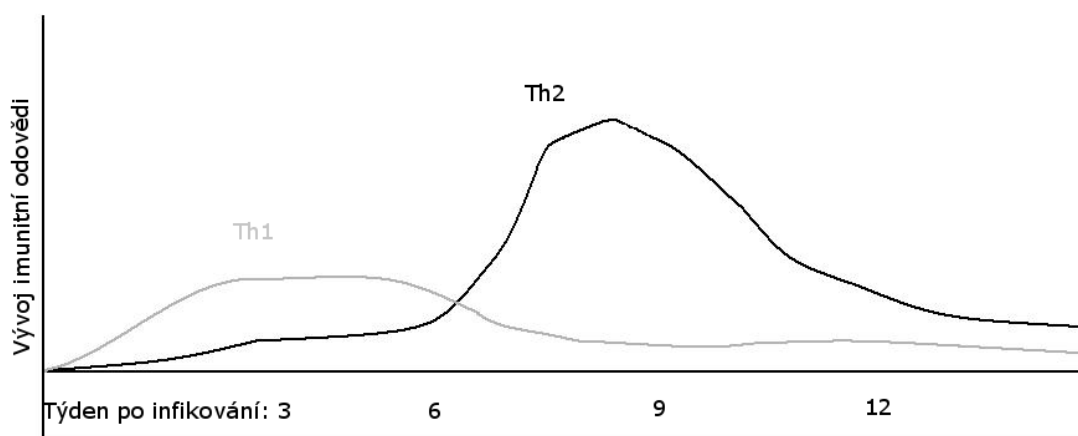
---

<sup>2</sup> Th buňky rozdělujeme na Th1 a Th2 dle účinku a spolupráce s dalšími buňkami. Th1 jsou buňky buněčné imunity a spolupracují s makrofágy. Th2 buňky jsou zástupci imunity humorální a spolupracují s B-lymfocyty (Hořejší a Bartůňková, 2005).



především na začátku infekce, v návaznosti na průnik cercárie do těla hostitele (Pearce and MacDonald, 2002).

V chronické fázi nastupují Th2 buňky, které reagují již konkrétně na přítomnost vajíček ve tkáni (McManus and Loukas, 2008). Nejzávažnější formou chronické schistosomózy je forma hepatosplenická, která je doprovázena jaterní fibrózou a hypertenzí v portálním oběhu, což ovlivňuje i slezinu (Pearce and MacDonald, 2002).



**Obr. 2: Vývoj imunitní odpovědi. (Zdroj: Přejato z Pearce and MacDonald, 2002. Upraveno).**

Jak bylo řečeno výše, imunitní odpověď je u vnímavého hostitele směřována především vůči vajíčkům zachyceným ve tkáni. (McManus and Loukas, 2008). Když se vajíčka dostávají z krevního oběhu do střeva, aby mohla dokončit cyklus, vyvolávají v hostiteli silnou Th2 imunitní odpověď. Ta vajíčka, která neproniknou ven z portálního oběhu, jsou unášena do jater, kde se zachytávají v tenkých cévách a tam později hynou. Jejich přítomnost ve tkáni jater vyvolává silnou imunitní odpověď, která se projevuje tvorbou granulomů. Granulomy jsou tvořeny kolagenními vlákny a buňkami imunitního systému hostitele – makrofágy, eozinofily a  $CD4^+$  T-lymfocyty. Když vajíčko uhyne, granulom se rozpadá a uvolňuje se po částech do krevního oběhu hostitele, čímž způsobuje zvýšení krevního tlaku a následnou fibrózu jater. (Pearce and MacDonald, 2002).

Protože schistosoma patří mezi parazity živící se krví, jsou pro ni zdrojem potravy proteiny krve hostitele. Získávání živin (tj. odbourávání hemoglobinu z erytrocytů, rozklad albuminu a dalších plazmových proteinů) a jejich následného trávení se u schistosom účastní proteolytická kaskáda cysteinových a aspartických proteáz. (Delcroix et al., 2006). Samec *S. mansoni* stráví denně desítky tisíc červených krvinek svého definitivního hostitele, samice

dokonce statisíce (Lawrence, 1973). Na trávení krevních proteinů se podílejí speciální membránové kanály, nízké pH lumenu střeva a peristaltika střeva parazita.

Pohyb cévami, z nichž některé jsou jen o málo širší než průměr parazita, není jednoduchý. Parazit musí být schopen ovlivňovat a kontrolovat hostitelské prostředí (fyziologii hostitele). K průchodu cévami potřebuje ovlivňovat vazokonstrikci<sup>3</sup> a vazodilataci<sup>4</sup> hostitele. Využívá k tomu různé biomolekuly – peptidy, deriváty aminokyselin, lipidy i některé plyny. (Da'ara and Skelly, 2011).

Malý peptid – bradykinin, který je aktivován serinovou proteázou kallikreinem, patří mezi silné vazodilatátory. Enzym sK1 izolovaný z dospělce *S.mansoni* způsobil u pokusného zvířete náhlé snížení krevního tlaku v tepnách. (Carvalho et al., 1998) S myším kallikreinem sdílí sekvenční podobnost také serinová proteáza SmSP1 (*S. mansoni* serine protease 1) nalezená u dvou stádií parazita – schistosomuly a dospělého samce. (Cocude et al., 1999). SmSP1 sdílí podobnost s myším kallikreinem. Gen kóduje celkem tři domény, které dohromady tvoří celou SmSP1. Na C–konci je trypsinová doména, jež je podobná savčímu kallikreinu; LDLr doména se nachází uprostřed a směrem k N–konci se nachází cubulin–like extracelulární doména. (Cocude et al., 1999).

Na cévy hostitele působí též deriváty aminokyselin parazita, např.: histamin a serotonin, deriváty histidinu a tryptofanu. Jak obratlovci, tak bezobratlí používají histamin jako signální molekulu. U schistosomy jej najdeme hlavně v periferní nervové soustavě. Parazit může ovlivňovat histaminový signalizační systém hostitele působením na receptory spřažené s G–proteinem. (El-Shehabi and Ribeiro, 2010). Serotonin je účinný vasodilatátor, u obratlovců je ukládán v trombocytech a působí při poranění cévní stěny. U schistosom je serotonin přítomný v nervové soustavě a je také biologicky aktivní. (Day et al., 1994). *S. mansoni* disponuje enzymem – tryptofan hydroxylázou, která ovlivňuje hladinu serotoninu v těle živočicha. Schistosoma má také transportér, který může přijímat serotonin z prostředí. Tento druh transportéru můžeme najít právě u stádií (schistosomula, dospělec), která se pohybují v krevním řečišti definitivního hostitele (Patočka and Ribeiro, 2007).

Lipidické povahy jsou eikosanoidy, jsou to signální molekuly, jejichž struktura je odvozená od mastných kyselin. Rozlišujeme 4 skupiny eikosanoidů – prostaglandiny, prostacykliny, tromboxany a leukotrieny. (Salafsky and Fusco, 1987). Eikosanoidy byly studovány jako látky, které by mohly mít vliv na imunitní systém hostitele. Mezi konkrétní

---

<sup>3</sup> Vazokonstrikce – zúžení cév, zejména arteriol (Velký lékařský slovník. On-line, cit. 15.3.2012).

<sup>4</sup> Vazodilatace – rozšíření cév, umožňuje větší průtok krve (Velký lékařský slovník on-line, cit. 15.3.2012).

aktivní eikosanoidy schistosomy patří leukotrien B4 a C4, které mají vliv na vazokonstrikci hostitele. (Back, 2007, cit. dle Da' dara and Skelly, 2011).

Plynnou molekulou způsobující vazodilataci je oxid dusnatý. U krevničky byl detekován oxid dusnatý jako signální molekula v nervové soustavě, ale byla prokázána i jeho přítomnost v trávicím traktu a poblíž povrchu červa. (Kohn et al., 2006).

Jak již bylo uvedeno, proteázy jsou molekuly schopné ovlivňovat fyziologii hostitele. Zajímavou skupinou proteáz u *S. mansoni* jsou serinové proteázy trypsinového typu (viz. kap. 1.5), do kterých patří i výše zmiňovaná SmSP1 a další proteázy trypsinového typu recentně identifikované v genomové databázi (*S. mansoni* GeneDB, <http://www.genedb.org/Homepage/Smansoni> ) Tyto enzymy jsou předmětem výzkumu v naší laboratoři.

Cílem této práce bylo sekvenčně anotovat a poté rekombinatně exprimovat dvě „trypsin-like proteázy“ z této skupiny. Konkrétně se jedná o Smp\_103680 a Smp\_141450 (uvedena jsou katalogová čísla proteáz ze Schisto GeneDB, Berriman et al., 2009).

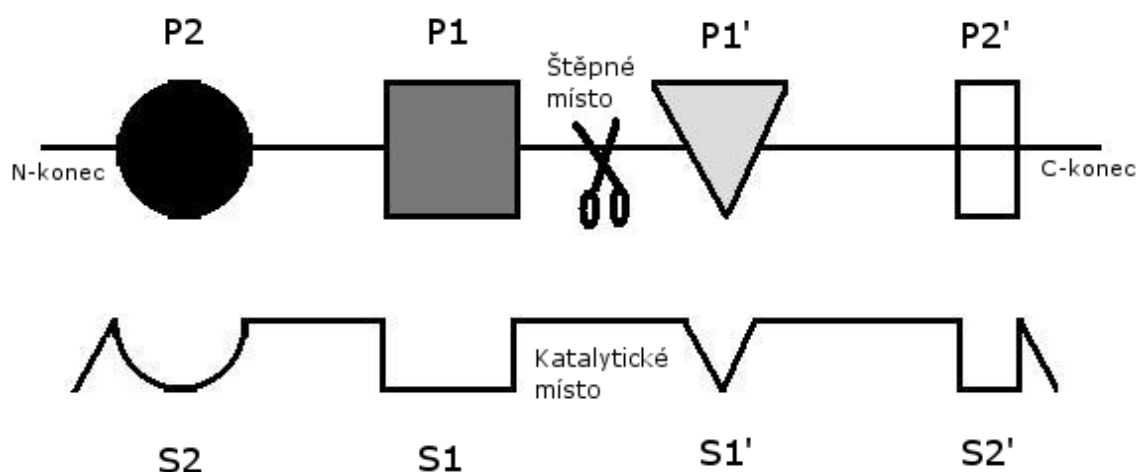
Smp\_103680 je proteáza s trypsinovou specifitou podobná savčím epiteliálním transmembránovým proteázám, a tudíž by hypoteticky mohla mít roli v hostitelsko-parazitárních interakcích. Gen pro tuto proteázu kóduje dvě domény: trypsinovou a cubulin-like (CUB). (Schisto Gene DB; Berriman et al., 2009)

Smp\_141450 sdílí sekvenční podobnosti spíše s proteolytickými enzymy bezobratlých. Na rozdíl od výše zmiňovaných se jedná o proteázu chymotrypsinovou, nikoli trypsinovou. ačkoliv patří do „trypsin-like“ skupiny klanu PA (Rawlings and Barrett, 2004b).

### **1.5. Charakteristika proteáz**

Proteázy (proteolytické enzymy, peptidázy, peptidické hydrolázy) jsou enzymy, které štěpí proteiny a jejich části pomocí hydrolýzy. Tu proteázy mnohonásobně urychlují (Hedstrom, 2002). Řadíme je tedy mezi hydrolázy (Alberts et al., 2008).

Specifita proteáz se popisuje podle modelu (Obr. 3), kde každé místo enzymu vázající substrát (S) je schopné reagovat s postranním řetězcem aminokyseliny substrátové molekuly (P) (Rawlings and Barret, 2007).



**Obr. 3: Substrátová specifita proteáz (Zdroj: Převzato z Rawlings and Barrett, 2007. Upraveno).**

Proteázy rozdělujeme dle tří hlavních kritérií: „místa akce“ uvnitř enzymu, mechanismu katalýzy a molekulární struktury. Místo na řetězci, kde proteázy působí, může být uvnitř peptidového řetězce, pak se jedná o endopeptidázy, nebo zvenku, potom jsou to exopeptidázy (Rawlings and Barret 1993). Dle mechanismu katalýzy rozeznáváme jako hlavní skupiny proteázy serinové, treoninové, cysteinové, aspartické, glutamové a metaloproteázy (viz. Tab. II). Třetím kritériem je molekulární struktura, která proteázy rozděluje do klanů a rodin. Rodina obsahuje proteázy evolučně příbuzné s podobnou strukturou. Klan sdružuje rodiny se společným předkem (Kašný et al., 2009).

**Tab. II: Rozdělení proteáz dle mechanismu katalýzy (Rawlings and Barret, 2007).**

Proteázy	Primární katalytická skupina	Sekundární katalytická skupina
Serinové	Hydroxylová skupina serinu	Imidazolový dusík histidinu
Treoninové	Hydroxylová skupina treoninu	N-koncová $\alpha$ -aminoskupina
Cysteinové	Thiolová skupina cysteinu	Imidazolový dusík histidinu
Aspartické	Karboxylové skupiny 2 zbytků kyseliny asparagové a navázaná voda	-
Glutamátové	Karboxylová skupina glutamátu	Amidová skupina glutaminu
Metaloproteázy	Atom kovu (nejvíc Zn) a navázaná voda	Karboxylová skupina glutamátu

Serinové proteázy tvoří přibližně třetinu proteáz a jsou zodpovědné za mnoho důležitých fyziologických procesů u obratlovců i bezobratlých. Katalytickou triádu serinových proteáz tvoří aminokyseliny: histidin, kyselina asparagová a serin. Serinové proteázy jsou syntetizovány jako neaktivní prekurzory – tzv. zymogeny. Jejich univerzální struktura má tři domény – katalytickou, vázající substrát a doménu pro aktivaci zymogenu (na N–konci). K tomu, aby byl enzym plně funkční, je třeba odstříhnutí zymogenové domény (Rawlings and Barret, 2004b).

Serinové proteázy klanu PA dělíme podle jejich aktivity do tří skupin – chymotrypsinové, trypsinové a elastázové. Specifita pro navázaný substrát je závislá pouze na P1 místě. Chymotrypsinové preferují v P1 pozici hydrofilní aromatické aminokyseliny, nejlépe fenylalanin. Trypsinové preferují striktně arginin nebo lysin a elastázové malé alifatické kyseliny, hlavně alanin. (Hedstrom, 2002.)

Treoninové proteázy mají mechanismus katalýzy velmi podobný serinovým (více Tab. II). Příkladem treoninových proteáz je proteasom, který je zodpovědný za degradaci proteinů v eukaryotických buňkách (Groll et al., 1997).

Aminokyselinou provádějící katalýzu je u cysteinových proteáz cystein. Ten je součástí tzv. katalytické triády těchto proteáz spolu s histidinem a asparaginem (Rawlings and Barret, 2004a). Cysteinové proteázy pracují uvnitř i vně buněk. Mají důležitou roli při interakcích s definitivním hostitelem (Dalton et al., 2004, cit dle Kašný et al., 2009).

Aspartické proteázy pracují nejčastěji v kyselém prostředí. Katalytická aktivita je zajišťována dvojicí asparagových kyselin, které aktivují vodu (více Tab. II). Nejznámější aspartickou proteázou je trávicí enzym pepsin (Rawlings and Barrett, 2007).

Glutamátové proteázy mají mechanismus katalýzy podobný aspartickým. Aktivaci vody ale vykonává kyselina glutamová a glutaminové zbytky (více Tab. II, Rawlings and Barrett, 2007).

Metaloproteázy zprostředkovávají katalýzu za pomoci vody. Ta aktivuje kationty kovů (např. Zn, Co, Mn, Ni, Cu). Aby reakce byla úspěšná, musí být kationty vázány v přesných pozicích řetězce aminokyselin (Auld, 2004, cit. dle Kašný et al., 2009).

## **2. Cíle práce**

Cílem mé bakalářské práce je exprese výše uvedených proteáz (dva enzymy pod katalogovým číslem Smp\_103680 a Smp\_141450) v různých expresních systémech (*Escherichia coli*, *Escherichia coli* SHuffle a *Kluyveromyces lactis*). Práce byla koncipována za účelem osvojení si základních biologických a biochemických metod, např.: (PCR, klonování do vektorů, sekvenace, transformace bakterií a kvasinek, SDS-PAGE, detekce proteolytických aktivit).

### 3. Materiály a metody

#### 3.1. Izolace genetického materiálu

Genetický materiál byl izolován z dospělých jedinců *S. mansoni*. Pomocí RT-PCR (PCR spojená s reverzní transkripcí, využívá retrovirového enzymu reverzní transkriptázy pro převedení mRNA na jednořetězcovou DNA) byla připravena cDNA. RT-PCR byla provedena dle pokynů výrobce (cDNA Synthesis with SuperScriptIII RT, Invitrogen).

#### 3.2. Amplifikace DNA pomocí PCR

Pro amplifikaci cDNA studovaných proteáz Smp\_141450 a Smp\_103680 byly použity specificky (dle DNA sekvence) navržené primery (Tab. III a IV, Invitrogen). V případě Smp\_103680, kdy je samostatně exprimována trypsinová doména, byla klonována pouze tato doména bez CUB domény. Schémata nasednutí primerů na sekvence proteáz jsou na obrázcích 4 a 5.

**Tab. III: Použité primery pro *E. coli*.**

Proteáza	Název primeru	Sekvence primeru
Smp103680	Smp103680spFRD	CACCATGGAGAGTAGAATTATTGGTG GAGAAATATC
	Smp103680spREV	TTATGATTGAATAATTGAAGAGATCC AAT
Smp141450	Smp141450FRD	CACCATGAAATTAGAATATCGTATAC
	Smp141450FRD	TCATTGTTTAAACCAACCATT

**Tab. IV: Použité primery pro *K. lactis*.**

Proteáza	Název primeru	Sekvence primeru
Smp103680	xhoSmp80FRDhis KL	CATACTCGAGAAAAGACATCATCATC ATCATCATATGGAGAGTAGAATTATT GGTGGAGAAATATC
	xhoSmp80FRD KL	CATACTCGAGAAAAGAATGGAGAGTA GAATTATTGGTGGAG
	bamSmp103680spREV	GATAGGATCCTTATGATTGAATAATTG AAGAGATCC
Smp141450	xhoSmp50FRDhis KL	CATACTCGAGAAAAGACATCATCATC

		ATCATCATATGAAATTAGAATATCGTA TACAAAATGGTTATC
	xhoSmp50FRD KL	CATACTCGAGAAAAGAATGAAATTAG AATATCGTATACAAAATGGTTATC
	bamhSmp50REV	CATAGGATCCTCATTGTTTAAACCAAC CATTTCCAGC

ATGAAATTAGAATATCGTATACAAAATGGTTATC CAGTAAATCTTGGTGAATTTCCAATG  
ATTGTATTACTTGGTAATACACATTTATGACTGGAACAATTATAGCACCTGATAAA  
ATTTTAACAGCTGGACATTGTGCATGTGGTGATCCAACATATGAAGTAGATTTTTCGAT  
TATGTGAATGGATCAATTAGTAACCATGATGAATTAGGTGGTTCACCTGATATATCAATT  
TTAATGTTAAATAAAAAATTTTCATCTTTCAAAGGATGGATAGAAAATTGGTTTATTAAAT  
TATAATTATTCTATGAATGATACACAAGAAAAAGAAAAAAGAATACAGATTTTTTTGTA  
TTAGTTTTGGTGAAGATAAATCAATTGAAATGTCAATGGGTCAATTACGTTTAGGTATA  
ATAAAATTGGATGAATGTCCAAAAATATTAATAACCAACTGATGGAGCACTTTGTTCT  
AATATTAATGGTAATCATCAAGGACCAGATGTTGGAGATAGTGGAGGTCCTATTTTTGAT  
ATAAATGGACGTGTTGTTGGTATTACA TCAATAGCTGGAAATGGTTGG TTTAAACAATGA

primery

**Obr. 4: Nukleotidová sekvence Smp\_141450 s naznačeným přisednutím primerů.**

ATGGAGAGTAGAATTATTGGTGGAGAAATATC TAGACCAGGTCAATGGCCATGGATGGTA  
TCAGTAAGAGAAAATGATCAATTTTCGATGTGGTGCCAGTTTAATTAGTAGCAATGGTTA  
TTAACAGCAGCTCATTGTTTTCCGAAAAATATAAATCTAGACAATTGGACAGTCCACATT  
GGTGATTCTTATTTAGATTGGACTGATAGTGAAGAGATATTAATGAATATAAGTAGTATA  
TTAACTCATCCAAATTATCGTCTACATAAATTATATGATTATGATTATGCATTGATAAAA  
ATTGTTTCACCAATTCAGTATACTTCAAACGAAGACCAATTTGTATATTGGATACAACA  
TTGATGAATACTAATGAATTAGATCGTTGTTATGTTGCAGGATGGGGAAGTTCAGAAGAT  
TCACCAATATCAAATGAATTACGTCATCTCCGTATTCCACTACTTAATTTAACGGTATGT  
AATCAAACAGAAGCATATCAAGGAAAATTAAGTAAACAATGATATGTGCTGGATATATT  
ATGGGTGGTAAAGACTCTTGTCAAGGAGATAGTGGTAGTCCATTAATGTGTCAATTACAT  
AATACTACTGATCATGCATGGTATCAAATTGGAATTGATCATTGGGAAATCATGTGCT  
GTGCTGGAAGTCCAGGAATTTATAGCAATCTTACATTTGCCAATAATT GGATCTCTTCAA  
TTATTCAATCATAA

primery

**Obr. 5: Nukleotidová sekvence Smp\_103680 s naznačeným přisednutím primerů.**

K samotné amplifikaci byla použita Phusion High-fidelity DNA polymerase (NEB) spolu s dalšími komponenty. Reakce pro PCR byla namíchána dle tabulky V a průběh teplot (Tab. V) při reakci byl dodržen dle protokolu (NEB) s optimalizací teploty pro přisednutí primerů (annealing) v závislosti na dané  $T_m$  primerů. Počet cyklů byl 35.



**Tab. V: PCR.**

Složení reakce	Objem [ $\mu$ l]	Průběh reakce	Teplota [ $^{\circ}$ C]	Čas [s]
cDNA	0,50	Počáteční denaturace	98	30
Primer F	0,75	Denaturace	98	10
Primer R	0,75	Annealing	x	30
dNTP	0,50	Extenze	72	30
Pufř	5,00	Závěrečná extenze	72	300
Polymeráza	0,25	Zchlazení	4	hold
H <sub>2</sub> O	17,25			
Celková reakce	25,00			

Po amplifikaci DNA byly vzorky nanášeny na agarózový gel (1%), ze kterého byly následně pomocí Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid) izolovány. A dále vpraveny do expresního vektoru (viz níže).

### 3.3. Zaklonování do expresních vektorů (plazmidů) a sekvenace

#### 3.3.1. *E. coli* (pET 100)

Geny byly zaklonovány do plazmidu pET 100 pomocí kitu Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kit (Invitrogen) za účelem exprese v *E. coli* expresních systémech. Plazmidy spolu se zaligovanými vzorky byly vpraveny do chemicky kompetentních bakterií *E. coli* DH5 $\alpha$  (NEB). Transformované buňky byly naočkovány na agarové plotny s ampicilinem (AMP) a inkubovány přes noc v inkubátoru (37  $^{\circ}$ C). Vybrané kolonie byly poté kultivovány, byla provedena kontrolní PCR na přítomnost genu. Poté byly vyizolované plazmidy sekvenovány (Laboratoř sekvenace DNA, Přírodovědecká fakulta UK Praha). Sekvenčně ověřené plazmidy byly použity pro další chemickou transformaci do expresních buněk BL21 (Invitrogen) či *E. coli* SHuffle (NEB) dle pokynů výrobců. Buňky byly injikovány na agarové plotny, které obsahovaly vhodné antibiotikum (AMP) a kultivovány přes noc v inkubátoru (37  $^{\circ}$ C pro BL21 a 30  $^{\circ}$ C pro SHuffle). Pozitivní kolonie byly použity na expresi.

#### 3.3.2. Anotace sekvencí

Obdržené sekvence byly anotovány pomocí programů Lasergen (DNASTAR) a porovnány s databázemi.

### 3.3.3. *K. lactis* (pKLAC2)

Aby bylo možné vzorky zaklonovat do expresního vektoru (pKLAC2, NEB), bylo nejprve nutné restriktivně štěpit koncové části jak PCR produktů, tak plazmidu pomocí restriktivních enzymů (XhoI a BamHI, Fermentas). Takto upravené vzorky byly nanесeny na 1% agarózový gel, vyčištěny a ligovány pomocí T4 ligázy do stejně ošetřeného plazmidu. Plazmid spolu se zaligovanými vzorky byl vpraven do chemicky transformovaných kompetentních buněk bakterie *E. coli* – DH5 $\alpha$  (NEB) dle pokynů poskytovatele. Buňky s vloženým plazmidem byly naočkovány na agarové plotny (selektce na základě antibiotika – AMP) a přes noc ponechány v inkubátoru (37 °C). Druhý den byly přeočkovány.

Následně byla provedena kontrolní PCR, zda došlo ke vložení vzorku do plazmidu. Sekvence byla provedena laboratoří sekvenace DNA (Přírodovědecká fakulta UK). K sekvenaci byly použity sekvenační primery pro *K. lactis*:  $\alpha$ -Mating Factor Sequencing Primer, pKLAC1 Reverse Sequencing Primer dodávané spolu s *Kluyveromyces lactis* expression kit (NEB).

Pro kvasinkový systém bylo ještě nutné plazmid zlinearizovat a vytvořit tzv. expresní kazetu. Plazmid pKLAC2 s vloženým genem byl tedy linearizován pomocí restriktivního enzymu SacII. Pomocí takto připravené expresní kazety byly transformovány chemicky kompetentní kvasinky dle pokynů výrobce (*K. lactis* expression kit, NEB).

### 3.4. Expresní systémy

Zvolené expresní systémy byly: *E. coli* BL21 (Invitrogen), *E. coli* SHuffle (NEB) a *Kluyveromyces lactis* (NEB). *E. coli* SHuffle obsahují enzym (izomerázu disulfidických můstků exprimovaného proteinu) napomáhající správnému složení exprimovaného proteinu.

### 3.5. Expresa

Růst a exprese buněk byly provedeny dle pokynů v protokolech pro jednotlivé expresní systémy: pro *K. lactis* (*K. lactis* protein expression kit, NEB), pro *E. coli* SHuffle (Protocol for expression using shuffle, NEB) a pro *E. coli* BL21 (BL21 Star™(DE3) One Shot competent cells, Invitrogen).

#### 3.5.1. Expresa v *E. coli* (BL21)

Expresa v *E. coli* BL21 byla prováděna ve velkém objemu. Přes noc narostlá 5ml kultura s AMP (100  $\mu$ l/ml) a glukózou o finální koncentraci 20 mM byla inokulována do Erlenmeyerovy baňky stejného média. Ve chvíli, kdy bakterie dosáhly OD<sub>600</sub> v rozmezí 1.0 – 1.5, byly bakterie koncentrovány centrifugací 3000 g/ 10 min. Poté bylo přidáno 250 ml LB

média s AMP bez glukózy a s IPTG (1 mM), za účelem indukce exprese. Bakterie byly inkubovány v třepačce a přes noc při 37 °C a 220 rpm. Bakterie byly nahromaděny pomocí centrifugace (3000 g/10 min).

Byla izolována inkluzní tělíska obsahující nesolubilní exprimované proteiny. Bakterie byly nejprve rozsonikovány v pufru A (Tris-HCl, pH 6.0, 20 mM). Pomocí centrifugace (12000 g/10 min) byla oddělena cytoplazmatická frakce a inkluzní tělíska (pelet). Inkluzní tělíska byla rozsonikována v pufru A, propláchnuta tímtež pufrům a centrifugována (12000 g/10 min).

### **3.5.2. Expresa v *E. coli* SHuffle**

Expresa *E. coli* SHuffle byla provedena v 1 l LB média a 100 µl/ml ampicilinu. Baňka byla umístěna do třepačky při 30 °C a 140 rpm, dokud OD<sub>600</sub> nedosáhlo 0,4 – 0,8. Poté byly podmínky změněny, aby bylo možné začít expresi – teplota byla snížena na 16 °C při 140 rpm a bylo přidáno IPTG (0,4 mM). Třepání probíhalo přes noc. Poté byl odebrán vzorek (1 ml), kde byla zaklonována proteáza Smp\_141450, k měření aktivity.

### **3.5.3. Expresa v *K. lactis***

Kvasinky rostly na agarových plotnách obsahujících acetamid. Pouze kolonie s našimi zaklonovanými geny (Smp\_141450 a Smp\_103680) byly schopné využívat acetamid a byly tedy schopné růstu. Z plotny byly odebrány vzorky buněk *K. lactis* a byly vloženy do Erlenmeyerovy baňky se 100 ml LB média a 100 µl ampicilinu. Vzorky byly na noc uloženy do třepačky (220 rpm) při 28 °C. Poté byly vzorky centrifugovány (2500 g/10 min) a pelet byl rozmíchán s galaktosovým médiem.

Po přidání média byly vzorky opět vloženy do třepačky (220 rpm, 28 °C) a po časových intervalech (1 h, 2 h, 3 h, (5 h), přes noc) byly z média odebírány vzorky k následnému měření aktivity. Zesílení indukce exprese pomocí IPTG (0,4 mM) bylo provedeno jen u poloviny vzorků a polovina byla bez indukce.

### **3.6. Měření aktivity enzymu**

Vzorky z *E. coli* SHuffle byly naneseny na destičku a smíchány do finálního objemu 200 µl v TRIS-HCl pufru (20 mM, pH 8.0) se syntetickým peptidovým substrátem. Substrát (10 µM finální koncentrace) se lišil v závislosti na typu proteázy – pro Smp\_141450 byl použit substrát pro chymotrypsin – AAF-AMC (alanin-alanin-fenylalanin). Na substrátu je navázán aminomethylcoumarin (AMC), který je proteolytickou reakcí hydrolyzován a je

měřeno množství uvolněného AMC v čase. Vzorky byly pro maximální možnou detekci exprese pipetovány ve třech objemech (0,5  $\mu$ l, 5  $\mu$ l a 50  $\mu$ l).

Analýza proteolytických aktivit byla provedena pomocí fluorometru Infinite® M200 PRO (TECAN) o excitační vlnové délce 365 nm a světelné emisi 450 nm, počet cyklů 60, perioda 30 s. Pro srovnání a ověření aktivity byly měřeny dvě sady reakcí, jedna s inhibitorem serinových proteáz (PMSF - fenylmethylsulfonyl fluorid) a jedna sada bez inhibitoru.

Pro *K. lactis* byly odebírány vzorky média z Erlenmeyerových baněk v časových intervalech. Vzorky bez indukce byly odebrány po 1 h, 2 h, 3 h, 5 h a po celé noci (15 h) od začátku třepání. Vzorky s induktorem byly odebrány po 1 h, 2 h, 3 h a po celé noci (15 h) od začátku indukce. Nanesení na destičku a namíchání reakce probíhalo stejně jako u *E. coli* SHuffle. Substrát (10  $\mu$ M) se lišil v závislosti na typu proteázy. Vzorky byly pro srovnání pipetovány ve dvou objemech (2  $\mu$ l a 20  $\mu$ l).

### 3.7. SDS-PAGE elektroforéza

Vzorky byly analyzovány pomocí SDS-PAGE na 4-15 % Bis-Tris akrylamidových gelech (NuPAGE, Invitrogen). Elektroforéza probíhala v pufru: MES-SDS Running buffer (NuPAGE, Invitrogen). Vzorek expresního média z *K. lactis* byl odebrán a zkoncentrován pomocí centrifugace z 1 ml na 45  $\mu$ l. Poté byla část vzorku (12,5  $\mu$ l) smíchána s redukčním činidlem (17,5  $\mu$ l) a pufrem (5  $\mu$ l) (NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)) a nanesena na gel.

### 3.8. Purifikace proteinů

Z buněk *E. coli* BL21, expresního vektoru pET100 byly získány enzymy pomocí afinitní chromatografie. Enzymy byly purifikovány na základě afinitní chromatografie na HiTrap kolonce (GE Healthcare) s navázaným chelatačním činidlem – kobaltem, přes His tag na N-konci rekombinantů (6 histidinů na N-konci).

Z buněk *E. coli* byla získána inkluzní tělíska obsahující nesolubilní exprimované proteiny. Bakterie byly nejprve rozsonikovány v pufru A (Tris-HCl, pH 6,0, 20 mM). Pomocí centrifugace (12000 g/10 min) byla oddělena cytoplazmatická frakce a inkluzní tělíska (pelet). Inkluzní tělíska byla rozsonikována v pufru A, propláchnuta tímtež pufrem a centrifugována (12000 g/10 min).

Enzymy byly purifikovány z inkluzních tělísek na základě přilnavosti histidinové kotvy (záporný náboj) ke kladně nabitému kationtu kobaltu. Purifikace probíhala v 8 M médiu močoviny. Chelatační kolonka byla nabita 50 mM síranem kobaltnatým (CoSO<sub>4</sub>) a

ekvilibrována pufrem B (20 mM fosfát sodný; 0.5 M NaCl, 8 M močovina, 10 mM imidazol) o pH 8. Inkluzní tělíska rozpuštěná v 50 ml pufru C (6 M guanidin hydrochlorid, 20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM mercaptoethanol, pH 8) byla před nanesením na kolonku rozsonikována, 3 h ponechána při pokojové teplotě a poté centrifugována (12 000g/10 min), aby se nerozpuštěná inkluzní tělíska oddělila od roztoku. Rozpuštěná inkluzní tělíska (vzorek 7 ml) byla filtrována přes 0.22 syringe filtr před tím, než byla nanesena na kolonu a následně opláchnuta pufrem B (pH 8). Rekombinantní proteiny byly vymyty pomocí pufru B s přidaným 0.5 M imidazolem.

## 4. Výsledky

### 4.1. Sekvence

Amplifikace genů byla provedena pomocí PCR za využití specifických primerů (Tab. III). Geny byly osekvenovány a sekvence analyzovány pomocí DNASTAR programů. Jak nukleotidové, tak aminokyselinové sekvence pro obě proteázy jsou uvedeny na obrázcích 6 a 7. Aminokyselinové sekvence byly anotovány a porovnány se dvěma databázemi: s NCBI Protein Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a se SchistoGene DB (<http://www.genedb.org/Homepage/Smanson>).

Smp\_141450 je tvořena 600 bázemi. Jak bylo již zmíněno, jedná se o chymotrypsinovou proteázu. Pro chymotrypsinovou aktivitu jsou charakteristické aminokyseliny glycin a serin se specifitou v P1 pozici. Na obrázku 6 je červeně vyznačena katalytická triáda.

Srovnání s databází odhaluje sekvenční podobnosti s dalšími živočichy. Proteáza Smp\_141450 sdílí určitou podobnost s proteázou samičího reprodukčního traktu u octomilky. Podobnost je také s chymotrypsinovými proteázami bodalky *Glossina* sp.

```
ATGAAATTAGAATATCGTATACAAAATGGTTATCCAGTAAATCTTGGTGAATTTCCAATG
M K L E Y R I Q N G Y P V N L G E F P M
ATTGTATTACTTGGTAATACACATTTATGTAAGTGAACAATTATAGCACCTGATAAA
I V L L L G N T H L C T G T I I A P D K
ATTTAACAGCTGGACATTGTGCATGTGGTGATCCAACATATGAAGTAGATATTTTCGAT
I L T A G H C A C G D P T Y E V D I F D
TATGTGAATGGATCAATTAGTAACCATGATGAATTAGGTGGTTCACCTGATATATCAATT
Y V N G S I S N H D E L G G S P D I S I
TTAATGTTAAATAAAAAATTTTCATCTTTCAAAGGATGGATAGAAATTGGTTTATTAAT
L M L N K K F H L S K G W I E I G L L N
TATAATTATTCTATGAATGATACACAAGAAAAAGAAAAAAGAATACAGATTTTTTTGTA
Y N Y S M N D T Q E K E K K N T D F F V
TTAGGTTTTGGTGAAGATAAATCAATTGAAATGTCAATGGGTCAATTACGTTTAGGTATA
L G F G E D K S I E M S M G Q L R L G I
ATAAAATTGGATGAATGTCCAAAAATATTAATAACCAACTGATGGAGCACTTTGTTCT
I K L D E C P K N I K I P T D G A L C S
AATATTAATGGTAATCATCAAGGACCAGATGTTGGAGATAGTGGAGGTCCTATTTTTGAT
N I N G N H Q G P D V G D S G G P I F D
ATAAATGGACGTGTTGTTGGTATTACATCAATAGCTGGAATGGTGGTTAAACAATGA
I N G R V V G I T S I A G N G W F K Q -
```

Legenda:

pravděpodobná specifita k substrátu v P1 pozici

aktivní místo proteázy

### Obr. 6: Aminokyselinová a nukleotidová sekvence proteázy Smp\_141450.

Celkový počet bází pro Smp\_103680 je 996 bp. Gen kóduje dvě domény: predikovanou a zřejmě neúplnou membránovou cubulin-like doménu (CUB) o délce 291 bází a trypsinovou doménu o délce 735 bází. Trypsinová doména je ve většině stádií

exprimována odděleně, až na vajíčka, kde jsou exprimovány obě domény dohromady. Na Obr. 7 jsou obě domény naznačeny, stejně tak aktivní místa enzymu.

Jak bylo řečeno v kapitole 1.5, aktivními aminokyselinami těchto enzymů jsou histidin, kyselina asparagová a serin vyznačené na obrázcích červeně.

Anotace s proteinovou databází ukázala podobnosti na základě aminokyselinových sekvencí s enzymy ostatních živočichů. Největší podobnost sdílí Smp\_103680 se serinovými proteázami dalších motolic – *S. japonicum* a *Clonorchis sinensis*. Podobnost lze také nalézt s transmembránovými proteázami obratlovců a s prostasinovými<sup>5</sup> proteázami savců.

```

ATGTTTGACTACTTATTAATTACAGATGAGTATTATACAGATGTATATACATATTGTGGT
M F D Y L L I T D E Y Y T D V Y T Y C G
CAATTAATAATTACCTAATCCAATTGAAATCAATAGTTCACAAGTCTATATAAATTTGGT
Q L K L P N P I E I N S S Q V Y I I F G
ACAGATGATGCTAATCATGGAAAAGTTTTCTTCTTCACTATGAAACAATTGAGAAAGAG
T D D A N H G K G F L L H Y E T I E K E
TCATTGAAACCGAATAGTTTTTATTCATGTGGATTAGCACTTCAATTCAATGATGATGGC
S L K P N S F Y S C G L A L Q F N D D G
TTTGAATGTAATGATATTCAAATGGAGAGTAGAATTATTGGTGGAGAAATATCTAGACCA
F E C N D I Q M E S R I I G G E I S R P
GGTCAATGGCCATGGATGGTATCAGTAAGAGAAAATGATCAATTTTCGATGTGGTGCCAGT
G Q W P W M V S V R E N D Q F R C G A S
TTAATTAGTAGTCAATGGTTATTAACAGCAGCTCATTGTTTTCCGAAAAATATAAATCTA
L I S S Q W L L T A A H C F P K N I N L
GACAATTGGACAGTCCACATTGGTGATTCTTATTAGATTGGACTGATAGTGAAGAGATA
D N W T V H I G D S Y L D W T D S E E I
TTAATGAATATAAGTAGTATATTAACACTCATCAAATTATCGTCTACATAAATTATATGAT
L M N I S S I L T H P N Y R L H K L Y D
TATGATTATGCATTGATAAAAATTGTTTCACCAATTCAGTATACTTCAAACGAAGACCA
Y D Y A L I K I V S P I Q Y T S K R R P
ATTTGTATATTGGATACAACATTGATGAATACTAATGAATTAGATCGTTGTTATGTTGCA
I C I L D T T L M N T N E L D R C Y V A
GGATGGGGAAGTTCAGAAGATTCACCAATATCAAATGAATTACGTCACTCCGTATTCCA
G W G S S E D S P I S N E L R H L R I P
CTACTTAATTTAACGGTATGTAATCAAACAGAAGCATATCAAGGAAAATTAAGTAAACA
L L N L T V C N Q T E A Y Q G K L T E T
ATGATATGTGCTGGATATATTATGGGTGGTAAAGACTCTTGTCAAGGAGATAGTGGTAGT
M I C A G Y I M G G K D S C Q G D S G S
CCATTAATGTGTCAATTACATAATACTACTGATCATGCATGGTATCAAATTGGAATTGTA
P L M C Q L H N T T D H A W Y Q I G I V
TCATTTGGGAAATCATGTGCTGTGCCTGGAACCTCCAGGAATTTATAGCAATCTTACATTT
S F G K S C A V P G T P G I Y S N L T F
GCCAATAATTGGATCTCTTCAATTATTCAATCATAA
A N N W I S S I I Q S -

```

Legenda:

pravděpodobná specifita k substrátu v P1 pozici

aktivní místo proteázy

pravděpodobně začátek trypsinové domény

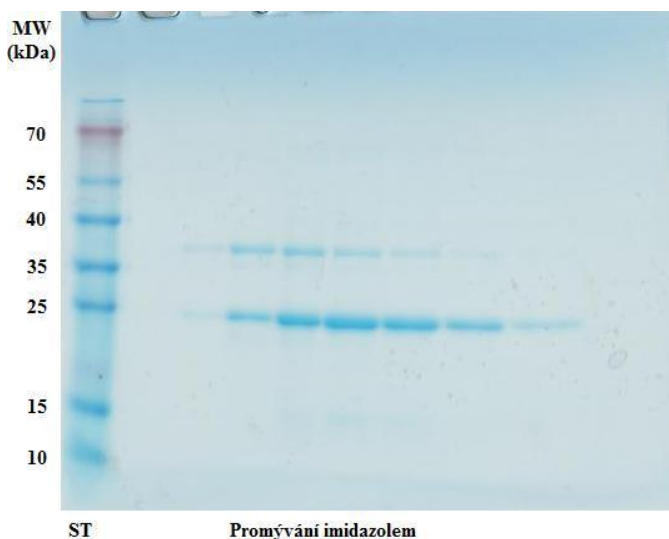
### Obr. 7: Aminokyselinová a nukleotidová sekvence proteázy Smp\_103680.

<sup>5</sup> Prostasin je serinová proteáza s trypsinovou aktivitou. Nejvíce je exprimována v prostatě a spermatu. Pravděpodobně se podílí na správné funkci prostaty a potlačení nádorové aktivity (www.bdbiosciences.com, cit, 5.4.2012).

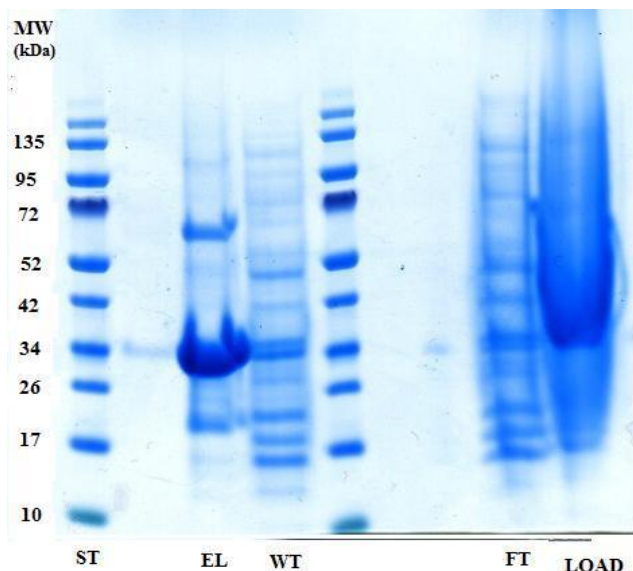
## 4.2. Vyhodnocení exprese

### 4.2.1. *E. coli* BL21

Enzymy byly purifikovány pomocí afinitní chromatografie. Výstupy z purifikace lze nalézt na obrázcích 8 a 9. Na obrázku 8 je znázorněna purifikovaná proteáza Smp\_141450 (přibližně 22 kDa), kdy byl enzym čištěn pomocí gradientního promývání imidazolem. Obrázek 9 je výstupem z afinitní chromatografie založené na přilnavosti histidinu ke kationtům kovů, znázorňuje proteázu Smp\_103680 (přibližně 37 kDa).



Obr. 8: Purifikace Smp\_141450 (promývání imidazolem, ST – molekulární standard).



Obr. 9: Purifikace Smp\_103680 pomocí afinitní chromatografie (ST – molekulární standard, EL – eluce, WT – wash through – promytí, FT – flow through – proteklá nenavázaná frakce vzorku, LOAD – startovní proteinový vzorek po rozpuštění inkluzí).



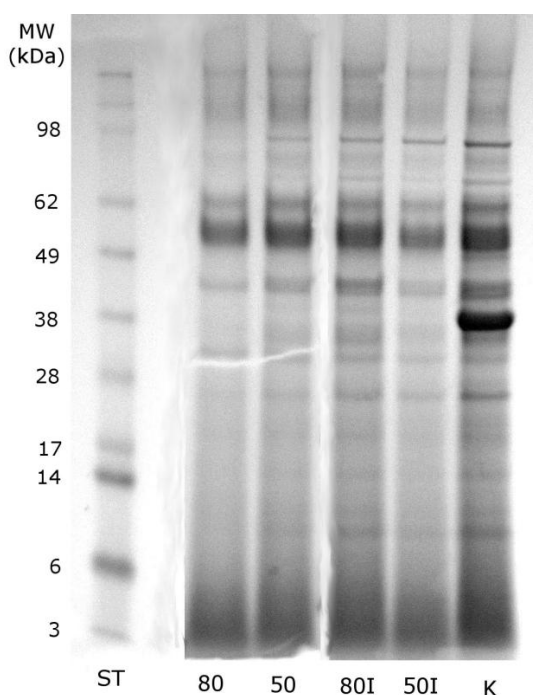
#### 4.2.2. Aktivita enzymů exprimovaných v *E. coli* SHuffle a *K. lactis*

Aktivita enzymů byla měřena pomocí fluorescenčního přístroje Infinite® M200 PRO (TECAN). Měření bylo provedeno pro obě proteázy v *K. lactis* a pro proteázu Smp\_141450 navíc i v *E. coli* SHuffle. U proteáz exprimovaných v *K. lactis* nebyla detekována žádná aktivita serinových proteáz.

Z měření aktivity Smp\_141450 v *E. coli* SHuffle, kdy do reakce bylo přidáno 5  $\mu$ l, plyne následující: u reakce bez inhibitoru serinových proteáz stoupla aktivita z přibližně 6000 (relativní jednotky) na 10000 a u reakce s inhibitorem stoupla z 6000 pouze na 8000. Tudíž došlo k inhibici aktivity serinových proteáz.

#### 4.3. SDS-PAGE elektroforéza

Na obrázku 10 je fotografie z SDS-PAGE elektroforézy. Znázorňuje výsledek z exprese v *K. lactis*. Vzorky pro elektroforézu byly odebrány ze vzorků exprimovaných přes noc. Vzorky byly zakoncentrovány z 1 ml na 45  $\mu$ l. Velikost zkoumaných proteáz je následující: Smp\_141450 má velikost 21,77 kDa, Smp\_103680 je velká 37,44 kDa. Na obrázku nejsou vidět žádné bandy, je tedy možné, že proteázy nebyly v kvasinkovém systému *K. lactis* vůbec exprimovány, nebo jsou v prostředí vnějšího média nestabilní.



**Obr. 10: Expres v *K. lactis*. (ST – molekulární standard, 80 – Smp\_103680, 50 – Smp141450, K – kontrola, 80I – Smp\_103680 indukovaná IPTG, 50I – Smp\_141450 indukovaná IPTG).**

## 5. Diskuze

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala proteázami Smp\_141450 a Smp\_103680 z lidského parazita *S. mansoni*. Ze srovnání sekvencí zkoumaných proteáz se sekvenčními databázemi je možné pokusit se odhadnout jejich funkce.

Proteáza Smp\_141450 je chymotrypsinová proteáza, která sdílí podobnost hlavně s proteázami bezobratlých, z čehož lze předpokládat, že bude mít nejspíš funkci ve vnitřní fyziologii parazita.

Proteáza Smp\_103680 je trypsinová proteáza, která má vysokou sekvenční podobnost s proteázami savců (makak, pes, morče), kteří mohou být také definitivními hostiteli parazita ([www.merckvetmanual.com](http://www.merckvetmanual.com), 17. 4. 2012). Tyto podobnosti by mohly napovídat funkci v hostitelsko–parazitárních interakcích.

Proteázy byly exprimovány v různých expresních systémech – byl použit běžný expresní systém *E. coli* (BL21), speciálně modifikovaný systém *E. coli* (SHuffle) a kvasinkový expresní systém *Kluyveromyces lactis*.

Z expresí v *E. coli* (BL21) byla získána inkluzní tělíska, ze kterých byly vyzískány proteázy, které byly nadále purifikovány chromatografickými metodami. Proteázy budou refoldovány a bude se s nimi nadále pracovat – budou vytvořeny protilátky a imunizována pokusná zvířata; dojde k charakterizaci proteáz: lokalizace, strukturální charakterizace (3D modely). Dále budou detekovány biologické funkce proteáz – případná přítomnost v enzymatických kaskádách parazita, biologická aktivita proteáz in vitro a další.

Pro geny exprimované v systémech *E. coli* SHuffle a *K. lactis*, které jsou schopné produkovat již správně složený protein, bylo provedeno měření aktivity enzymu. Z provedených měření vyplývá, že u proteázy Smp\_141450 ani u proteázy Smp\_103680 exprimované v systému *K. lactis* nebyla naměřena aktivita serinových proteáz. Použitý induktor exprese neměl na aktivitu enzymu vliv. Ani v případě průkazu elektroforézou nebyly zaklonované proteázy vůbec detekovány.

Jak bylo zmíněno výše, kvasinkový systém *K. lactis* by měl produkovat již správně složený protein. Je tedy možné, že zkoumané proteázy byly špatně složeny a nebyly tudíž aktivní. Takže nebylo možné naměřit jejich aktivitu. Špatné složení mohlo být zapříčiněno například špatně spojenými cysteinovými můstky (Smp\_141450 má 5 cysteinů, Smp\_103680 má 11 cysteinů).

Proteáza Smp\_141450 exprimovaná v systému *E. coli* SHuffle vykazuje při měření aktivity ve všech koncentracích alespoň mírný vzrůst. A to i v případech s přidaným inhibítorem serinových proteáz. Z tohoto důvodu se domníváme, že se jednalo o jinou

proteázu, která byla přímo z expresního systému. Další možností, proč byla mírná aktivita detekována i při měření v přítomnosti inhibitoru, je volba nevhodného inhibitoru serinových proteáz.

## 6. Závěr.

Proteázy Smp\_141450 a Smp\_103680 z krevničky *Schistosoma mansoni* byly exprimovány ve třech expresních systémech – *E. coli* (BL21), *E. coli* (SHuffle) a *Kluyveromyces lactis*. Ze systému *E. coli* (BL21) byly získány obě proteázy. Ze systému *E. coli* (SHuffle) nebyly proteázy získány. Pro úspěšnou izolaci proteáz by bylo vhodné přemístit histidinovou kotvu z N–konce na C–konec. Z kvasinkového systému *K. lactis* také nebyly proteázy získány. Je možné, že proteázy byly špatně složeny nebo byly v médiu nestabilní.

## 7. Zdroje

- Abdulla M-H et al., 2011. Proteomic identification of IPSE/alpha-1 as a major hepatotoxin secreted by *Schistosoma mansoni* eggs. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5: e1368.[cit. 23.4.2012]. Dostupné z: <http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0001368>.
- Alberts B. et al., The molecular biology of cell. 5th edn. New York: Garland Science 2008.
- Auld D. S., 2004. Catalytic mechanism of metallopeptidases. In Barrett, Rawlings, Woessner, Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd edn, Elsevier, Amesterdam, p. 268–89.
- Back M., 2007. Leukotriene receptros: crucial components in vascular inflammation. *Scientific world journal* 7: 1422–39.
- Berriman M. et. al., 2009. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Nature* 460: 352–58.
- Brant S. V. and Loker E. S., 2005. Can specialized pathogens colonize distantly related hosts? Schistosome evolution as a case study. *PLoS Pathogens* 1: 167–69.
- Brindely P. J. et al., 2001. Proteolysis of human hemoglobin by schistosome cathepsin D. *Molecular and biochemical parasitology* 112: 103–112.
- Carvalho W.S. et. al., 1998. Purification and partial characterization of kininogenase aktivitty from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 117: 311–19.
- Cocude C. at al., 1999. Identification of a developmentally regulated *Schistosoma mansoni* serine protease homologous to mouse plasma kallikrein and human factor I. *Parasitology* 118: 389–96.
- Da´dara A. and Skelly P. J., 2011. Manipulation of vascular function by blood flukes. *Blood Reviews* 25: 175–79.
- Dalton J. P. et al., 2004. Trematode cysteine endopeptidases. In Barrett, Rawlings, Woessner, Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd edn, Elsevier, Amesterdam, p. 1176–82.
- Davies S. J. and McKerrow J. H., 2003. Developmental plasticity in schistosomes and other helminths. *International journal for parasitology* 33: 1277–84.

Day T. A. et al., 1994. Serotonin and its requirement for maintenance of contractility in muscle fibres isolated from *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 108: 425–32.

Delcroix M. et al., 2006. A multienzyme network functions in intestinal protein digestion by a platyhelminth parasite. *The journal of biological chemistry* 281: 39316–29.

Despommier, D. D. a Karapelou, J. W., Parasite life cycles. 1st edn. New York: Springer, 1987., p. 72-77.

Després L. et al., 1993. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. *Molecular and biochemical parasitology* 60: 221–30.

Dunn B. M., 2002. Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases. *Chemical Reviews* 102: 4431–58.

Dvořák J. et al., 2008. Differential use of protease families for invasion of schistosome cercariae. *Biochimie* 90: 345–58.

El-Shebabi F. and Ribeiro P., 2010. Histamine signalling in *Schistosoma mansoni*: Immunolocalisation and characterization of a new histamine-responsive receptor (SmGPR-2). *International journal for parasitology* 40: 1395–406.

Groll et al., 1997. Structure of 20S proteasome from yeast 2.4 Å resolution. *Nature* 386: 436–41.

Harrison R. A. and Doenhoff M. J., 1983. Retarded development of *Schistosoma mansoni* in immunosuppressed mice. *Parasitology* 86: 429–38.

Hedstrom L., 2002. Serine Protease Mechanism and Specificity. *Chemical Reviews* 102: 4501–23.

Hořejší V. a Bartůňková. Základy imunologie. 3. vyd. Praha: Triton, 2005. p. 128–43.

Ingram J et al., 2011. Proteomic analysis of human skin treated with larval schistosome peptidases reveals distinct invasion strategies among species of blood flukes. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5: e1337. [cit. 23.4.2012] Dostupné z:

<http://www.plosntds.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pntd.0001337>

Jourdane J. and Théron A., 1987a. Larval development: Eggs to Cercariae. In Rollinson, Simpson. *The Biology of Schistosomes: from genes to latrines*. 1st edn. San Diego: Academic Press, 1987. p. 83–106.

Kašný, M. et al., 2009. Chapter 4. Peptidases of trematodes. *Advances in parasitology* 69: 205–97.

Khalil, L. F., Family Schistosomatidae (Stiles a Hassall, 1898). *Key to the Trematoda*. 1st edn. Wallingford: CABI Publishing, 2002. p. 419–32.

Kohn A. B. et al., 2006. *Schistosoma mansoni*: use of a fluorescent indicator to detect nitric oxide and related species in living parasites. *Experimental parasitology* 113: 130–33.

Lawrence J. D., 1973. The ingestion of red blood cell by *Schistosoma mansoni*. *Journal of parasitology*, 59: 60–63.

Lockyer A.E, et al., 2003. The phylogeny of the Schistosomatidae based on three genes with emphasis on the interrelationships of *Schistosoma* (Weinland, 1858). *Parasitology* 126: 203–24.

McKerrow J. H. and Salter J., 2002. Invasion of skin by *Schistosoma* cercariae. *Trends in parasitology* 18: 193–95.

McManus D. P. and Loukas A., 2008. Current Status of Vaccines for Schistosomiasis. *Clinical microbiology reviews* 21: 225–42.

Morgan J. A. et al., 2001. *Schistosoma mansoni* and Biomphalaria: past history and future trends. *Parasitology* 123: S211–28.

Patočka N. and Ribeiro P., 2007. Characterization of a serotonin transporter in the parasitic flatworm *Schistosoma mansoni*: cloning, expression and functional analysis. *Molecular and biochemical parasitology* 154: 125–33.

Pearce E. J. and MacDonald A. S., 2002. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature reviews. Immunology* 2: 499–511.

Rawlings N. D. and Barrett A. J., 2004a. Introduction: The clans and families of cysteine peptidases. In Barrett, Rawlings, Woessner, *Handbook of Proteolytic Enzymes*, 2nd edn, Amsterdam: Elsevier, p. 1051–71,

Rawlings N. D. and Barrett A. J., 2004b. Introduction: Serine peptidases and their clans. In Barrett, Rawlings, Woessner, Handbook of Proteolytic Enzymes, 2nd edn, Amsterdam: Elsevier, p. 1417–39.

Rawlings N. D. and Barrett A. J., 2007. Proteases. In Cox, Phillips. Handbook of proteins: structure, function, and methods, 1st edn, Chichester: John Wiley & Sons Ltd., p. 311-18.

Rawlings N. D. and Barrett A.J., 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal* 290: 205–18.

Rollinson, D. and Southgate, V. R., 1987b. The genus *Schistosoma*: A taxonomic appraisal. In Rollinson, Simpson. The Biology of Schistosomes: from genes to latrines. 1st edn. San Diego: Academic Press. p. 1–41.

Sajid M. and McKerrow J.H., 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and biochemical parasitology* 120: 1–21.

Salafsky B. and Fusco A. C., 1987. *Schistosoma mansoni*: a comparison of secreted vs nonsecreted eicosanoids in developing schistosomulae and adults. *Experimental parasitology* 64: 361–67.

BD Biosciences. © 2012 BD [cit. 5.4.2012] Dostupné z: [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)

NCBI blast. © 2012 [cit. 22.3.2012] Dostupné z: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Schisto Gene DB. © 2009-2010 [cit. 2.3.2012] Dostupné z: <http://www.genedb.org/Homepage/Smansoni>

The Merck veterinary manual. © 2011 [cit. 17.4.2012] Dostupné z: [www.merckvetmanual.com](http://www.merckvetmanual.com)

Velký lékařský slovník on-line.© Maxdorf 2008 [cit. 15.3.2012] Dostupné z: <http://lekarske.slovniky.cz/>